

海産無脊椎動物のオピンデヒドロゲナーゼのcDNA解析および組換え大腸菌を用いた生理機能の解明

著者	木村 朋寛
号	838
発行年	2005
URL	http://hdl.handle.net/10097/16644

氏 名(本籍) ^き木 ^{むら}村 ^{とも}朋 ^{ひろ}寛

学 位 の 種 類 博 士 (農 学)

学 位 記 番 号 農 博 第 8 3 8 号

学位授与年月日 平 成 18 年 3 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研 究 科 専 攻 農学研究科資源生物科学専攻
(博士課程)

学 位 論 文 題 目 海産無脊椎動物のオピンデヒドロゲナーゼの cDNA 解析
および組換え大腸菌を用いた生理機能の解明

論文審査委員 (主 査) 教 授 佐 藤 實
(副 査) 教 授 室 賀 清 邦
 教 授 谷 口 順 彦

論文内容要旨

第1章 緒言

オピンデヒドロゲナーゼ (OpDHs) は、アミノ酸とピルビン酸を基質とし、NADH を補酵素としてオピン類を生合成する酸化還元酵素である。アミノ酸基質特異性からオクトピンデヒドロゲナーゼ (OcDH)、アラノピンデヒドロゲナーゼ (AldH)、ストロンピンデヒドロゲナーゼ (StDH)、タウロピンデヒドロゲナーゼ (TaDH) および β -アラノピンデヒドロゲナーゼ (β -AldH) の5種類に分類されている。OpDHs はこれまでの研究により脊椎動物の乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) と同義的役割、すなわち嫌気的環境下でのエネルギー産生に重要な役割を持っているとされており、嫌気環境に曝した後や激しい運動をさせた後にオピン量が増加するといった間接的証明はされているが、遺伝子操作による直接的な証拠は得られていない。また、OpDHs は各種無脊椎動物に広く分布し、一部については酵素化学的性質も明らかにされているが、アミノ酸配列などの分子構造についてはほとんど知られていない。

本研究では、まず、OpDHs の cDNA 解析により一次構造であるアミノ酸配列情報を明らかにすることを目的とした。同時に、得られた配列情報を基に大腸菌での発現を試み、本酵素のアミノ酸基質特異性を明らかにすること、すなわち OpDHs の特定を試みた。次に、本研究で得られた cDNA 配列および推定アミノ酸配列を、これまでに解明されている他の生物種における OpDHs の cDNA 配列および推定アミノ酸配列と比較し、相同性や分子進化について検討した。最後に、嫌気環境・最少培地では増殖できない変異大腸菌に本酵素の遺伝子を導入することで本酵素の生理機能の解明を試みた。

第2章 オピンデヒドロゲナーゼの cDNA 解析および発現

セグロイソメ体壁筋、エゾアワビ貝殻筋、ホタテガイ閉殻筋、ウバガイ閉殻筋、およびハマグリ閉殻筋の5種の cDNA 解析を行い、その配列を基に大腸菌での発現を試みた。cDNA 解析の際に、内部配列決定のための汎用プライマーの設計を試みた。

先ず内部配列の解析を行い、決定された配列を基にしたプライマーを用いた 5'および 3'-RACE により両端の配列を解析し、それらを繋ぎ合わせることで全配列を決定した。解析された配列を検証し、発現ベクターを構築するため、全コード領域を含む断片を PCR で増幅し、サブクローニングした。

解析された配列はセグロイソメ、エゾアワビ、ホタテガイ、ウバガイ、およびハマグリでそれぞれ 1428、1430、1278、1377 および 1471 塩基であり、1191、1215、1200、1227、および 1230 塩基のコード領域があり 397、405、400、409、および 410 アミノ酸をコードしていると推定された (図 1-図 5)。ハマグリにおいては複数の核酸配列が解析され、推定アミノ酸配列も変化することからアイソザイムの存在が示唆された (図 5)。

内部配列決定のために設計したプライマー ODH-9F および ODH-11R (表 1) の組み合わせで PCR を実行したところ、試みた全ての種において目的断片の増幅が確認された (図 6)。本プライマーセットは他の多くの種でも利用可能であることが確認され、汎用プライマーとして今後の OpDHs の研究発展に大きく寄与するものと考えられる。

解析された配列を基に大腸菌での発現を試みた結果、発現量に差はあるものの、ハマグリ以外の全ての種において活性を持つ OpDHs の発現に成功した (表 2)。発現には pTV118N のベクター、および JM109 株と FMJ39 株の大腸菌株を用いた。JM109 株は一般的な大腸菌株であり、FMJ39 株は乳酸デヒドロゲナーゼ (lactate dehydrogenase, LDH) およびピルビン酸ギ酸リアーゼ (pyruvate formate lyase, PFL) 欠損株で嫌気環境・最少培地で増殖することが出来ない。FMJ39 株を用いた理由は、大腸菌由来の LDH が後の活性測定や精製において妨害物となると考えたので LDH 遺伝子を持たない FMJ39 株の利用が効果的だと考えたからである。

セグロイソメ由来の酵素は粗抽出物でタウリンを基質として JM109 で平均 180.5 ユニット、FMJ39 で平均 275.5 ユニットの活性を得ることができた (表 2)。FMJ39 の方が高い活性を得られるが、ばらつきは大きくなった。エゾアワビ由来の酵素はタウリンを

基質として Wild type で平均 81.5 ユニット、T2A 変異型では平均 45.8 ユニットの活性が得られた。ウバガイ由来の酵素はアルギニンを基質として JM109 で平均 15.5 ユニット、FMJ39 で平均 45.0 ユニットの活性を得ることができた。セグロイソメの場合と同様、FMJ39 に高い活性が得られた。ホタテガイ由来の酵素は、アルギニンを基質として FMJ39 で 1.2 ユニット程度の活性しか得られなかった。活性が弱く発現法の改良が必要であるが、基質のアミノ酸およびピルビン酸を加えない条件での値との差を考慮すると、本酵素はアルギニンを基質とする OcDH の可能性が高いと考えられる。ハマグリでも発現を試みたが、活性をもつ酵素の発現には至っていない。

大腸菌での発現により酵素の基質特異性つまり OpDHs の種類を明らかにすることが可能となり、セグロイソメおよびエゾアワビの OpDHs を TaDH と、ホタテガイおよびウバガイの OpDHs を OcDH と確定した。セグロイソメ由来の TaDH を完全精製し（図 6）、アミノ酸基質特異性を明らかにした（表 3）。その結果、タウリンに非常に特異的な酵素であることが明らかとなり、この性質は天然物由来の酵素とほぼ同様であった。エゾアワビは 60%飽和硫酸アンモニウム塩析の上清を 80%飽和にして遠心分離にかけた沈殿を透析して得た部分精製物で活性を測定した（表 4）。この処理により JM109 株においても基質としてのアミノ酸を加えない条件での NADH の NAD⁺への酸化、すなわち LDH 様活性がなくなることが確認された。相対活性を調べた結果、アラニンに対して天然型で 5.3%、T2A 変異型で 4.8%の相対活性を示し、有意な差が認められた。この性質は二番目のアミノ酸の違いであり、N 末端側のアミノ酸が基質特異性に影響を与える可能性が示唆された。ウバガイでもエゾアワビと同様に硫酸分画を行って活性を測定した（表 5）。JM109 株および FMJ39 株で発現させたウバガイ OcDH はリジンに対して、それぞれ 3.8%および 3.7%の相対活性を示した。それ以外のアミノ酸では活性は認められず、アルギニンに対する基質特異性の高い酵素であった。

第3章 オピンデヒドロゲナーゼの分子進化

これまで知られている5種類のOpDHsは、基質とするアミノ酸の種類や基質特異性の高さなど酵素的性質がそれぞれ異なっている。そこで、これまでに解明されている海産無脊椎動物OpDHsのcDNA配列および推定アミノ酸配列を比較検討し、構造的特徴を探るとともに、系統樹を作製し、OpDHsの分子進化が従来の形態および解剖学的系統分類に沿うのか、もしくは基質特異性によって分類されるのか検討した。

推定アミノ酸配列の多重アライメント(図8)は、全体的に変異に富んでいるが、配列が非常によく保存された部分が全体に散らばっていることから、これらの酵素が同じ酵素ファミリーに属していると考えられる。この保存性の高い部分は酵素として重要な役割を果たしていると思われる。中でも、GGGNXAの配列(図8の18-23残基)は、脱水素酵素におけるNADH、FADHおよびNADPHといったジヌクレオチドの結合に関与する部分の共通配列GXGXXG/Aと対応しており、本酵素においても補酵素NADHの結合に関与している部分であると考えられる。他のNADHなどジヌクレオチドを補酵素とする脱水素酵素では、アラニンの部分はグリシンであることが多いが、海産無脊椎動物のOpDHsではアラニンであることが一つの特徴であると考えられる。

核酸配列相同性(表6右上)は、50%前後の値が多く見られた。しかし、腹足綱同士やマルスダレガイ目同士では61%とやや高くなった。イカ綱同士やイタヤガイ科同士では80%を超える更に高い値となっており、近縁になるにつれて値が高くなっていた。二枚貝綱では変異が多く起こっており、特にハマグリ(Mlu-1およびMlu-2)は同目のウバガイと61%の相同性を示すものの同綱のヨーロッパホタテガイとは21.2%と非常に低い値を示した。しかし、ホタテガイとは45%の標準的な相同性を示した。

アミノ酸配列相同性(表6左下)は40%前後の値が多く見られた。ここでも腹足綱同士では61%、マルスダレガイ目同士でも57%とやや高くなり、イカ綱同士やイタヤガイ科同士では90%前後の非常に高い値となっており、近縁になるにつれて値が高く

なっていた。

OpDHs 遺伝情報から作成した系統樹 (図 9) は、アミノ酸基質特異性によるクラスター (OpDHs 毎のクラスター) を形成することではなく、曲体亜門に属するイカ綱と腹足綱が直体亜門に属する二枚貝綱よりも小さなクラスターに収まるなど、形態学および解剖学的解析に基づく系統分類と一致していた。

第 4 章 オピンデヒドロゲナーゼの生理機能

本章では、遺伝子欠損により嫌気環境では増殖できない大腸菌株に本酵素の遺伝子を導入・発現させ、嫌気環境下での増殖能の再獲得を試み、本酵素の生理的役割について直接的証拠を得ることを目的とした。

大腸菌 FMJ39 株は LDH および PFL の欠損株であり、嫌気環境・最少培地で増殖が出来ないが、PFL のみ欠損の場合は、LDH が NAD^+ の供給者として働くと考えられるため、培地への酢酸塩の添加で増殖が可能となる。ウバガイ由来 OcDH 遺伝子を導入した pTVSsaFMJ39 では同条件下で多数のコロニーが認められ増殖が確認された (図 10)。よって、ウバガイ由来 OcDH 遺伝子の導入により FMJ39 株は嫌気環境下での増殖能を再獲得した。このことより OpDHs は嫌気環境下において NAD^+ の供給者として重要な機能を果たし、機能的に LDH と置き換え可能であることが示された。このことをより強く証明するために菌体内でオクトピンが生成されることを HPLC で確認した。菌体のエキス成分に標品のオクトピンのピークと同じ保持時間を持つピークが見られた (図 11)。このことから、導入した遺伝子は菌体内で正常に発現、翻訳され、生成された酵素は解糖で生じたピルビン酸と遊離のアルギニンからオクトピンを生成したことが確認された。本実験により、OpDHs の主な生理機能は、嫌気環境下における解糖を維持するための NAD^+ 供給であり、嫌気環境下でのエネルギー産生に重要な役割を持っていることが直接的に証明された。

第5章 総合考察

本研究で設計した共通プライマーODH-9F および ODH-11R による内部配列の解析を足がかりとする方法は、多くの種で OpDHs の cDNA 解析を可能にした。さらに、この方法で解析された配列を基に大腸菌で発現させることに成功し、基質特異性すなわち OpDHs の種類を明らかにすることが可能となった。その結果、セグロイソメおよびエゾアワビの OpDHs を TaDH、そしてホタテガイおよびウバガイの OpDHs を OcDH と確定した。このように、動物種により発現している OpDHs の種類が異なっており、その理由に興味を持たれた。

推定アミノ酸配列を多重アライメントに供した結果、全体的に変異が多いものの、非常に保存性の高い部分も散在し、その内の一つは補酵素 NADH の結合に関与している共通配列であると考えられる。

OpDHs 遺伝情報から作成した系統樹は、これまでの形態学および解剖学的解析に基づく系統分類と一致していた。OpDHs は近縁関係に応じて変異の程度が大きく変化しており、OpDHs ファミリーの cDNA 解析は、未だ不明な点が多い系統進化、とりわけ海産軟体動物間の科および属レベルでの類縁関係を明らかにするために役立つと考えられる。

OcDH 遺伝子の導入により FMJ39 株は嫌気環境・最少培地での増殖能を再獲得した。OpDHs は LDH と同様に嫌気環境における NAD^+ の供給者として機能し、機能的に LDH と置き換え可能であることが示された。本研究により、OpDHs の主な生理機能は、嫌気環境下における解糖を維持するための NAD^+ 供給であり、嫌気環境下でのエネルギー産生に重要な役割を持っていることが直接的に証明された。

5'	G CCG CCT TCT CAC GTC TTC TTT TTC CGC TGC TCG AGC TCT TAG CGC AGC CTG GCC CAG GAC	61
	TTG CAG TTG TGC TGT GGA TAA ATT GAC ATC ATG GTT GTC CTA ACT ATC TGT GGA GGA GGC	121
	M V V L T I C G G G	10
	AAT GCC GCC CAC ACG TTG GCT GGC ATA GCA TCC AAC CAG CCA AAC ATG GAG GTG AGA GTC	181
	N A A H T L A G I A S N Q P N M E V R V	30
	CTG ACC TTG TAT GCC GAC GAG GCA GAG CGA TGG ATC AAA TCC ATG GAG ACC AAC GAC TTC	241
	L T L Y A D E A E R W I K S M E T N D F	50
	ACC ACC ATC AAG TAT GCC ACC GGT AAG GAC CCT GTC CAC CTC AAA ACA AAG CCA AAG CTT	301
	T T I K Y A T G K D P V H L K T K P K L	70
	GTG ACC AAG AAT CCA GAG CAG GGA GCT ACT GGT GCA GAC ATC ATC GTC ATC ACA GTT CCT	361
	V T K N P E Q G A T G A D I I V I T V P	90
	GCT TTT GCG CAT GCT CAG TAC CTG ACA GCA TTA AAA CCC CAC GTG AAG CCT GGA ACT GTG	421
	A F A H A Q Y L T A L K P H V K P G T V	110
	GTT GTG GGT TTT CCG GGT CAG CCT GGC TTC GAC TTC GAG ATC ATG AAG ATC TGG GGA GAT	481
	V V G F P G Q P G F D F E I M K I W G D	130
	CTT GCC AAA CAA TGC ACG GTG ATG AAT TTC GTA TCC CTC CCC TGG GCT TGC CGT ATC AAG	541
	L A K Q C T V M N F V S L P W A C R I K	150
	GAG TTT GGA AAG TCT GTG GAA GTT CTG GCT ACC AAG GAT ATG ATG TTC GGG TCA GTG AGA	601
	E F G K S V E V L A T K D M M F G S V R	170
	AAT GGG ACT GTG GCT CCC AAG ATG GAT CCA ACT GCA ATG ATC CAA GGC TGC CTG GGG CCA	661
	N G T V A P K M D P T A M I Q G C L G P	190
	CTG CCA AGG TTG GAA TGC TCC GGA CAC CTG TTG GGC ATG TCC ATT ATG GCA GTC AAT GGC	721
	L P R L E C S G H L L G M S I M A V N G	210
	ATG CTC CAC CCC TCC ATC ATG TAT AAC AGG TGG CAT GAC TGG GAT GGC AAA CCA GTA GAT	781
	M L H P S I M Y N R W H D W D G K P V D	230
	GCT CCA CCA CTC TTT TAC CAT GGT CTG AGC CAG GCT GGT GCA GAC CTC TTG TCT GAT GTC	841
	A P P L F Y H G L S Q A G A D L L S D V	250
	AGC AAT GAA ACC ATT GCC ATT GCC AAG AAG GTC ATG GAA CAA CGT CAA GGA GTA GAT CTC	901
	S N E T I A I A K K V M E Q R Q G V D L	270
	AGC AAT GTC ATC CAT ATG CAT CCC TAT TAT ATC GGT GCC TAT CCG GAT GAC ATT AGT GAC	961
	S N V I H M H P Y Y I G A Y P D D I S D	290
	AAG AGC AGC CTC TAC ACC TGC ATA AAC ACC AAT GCA GGC TTC AAG GGT CTC ACC CAT CCC	1021
	K S S L Y T C I N T N A G F K G L T H P	310
	TGT ACC AAG ACT GCC GAT GGC AAG TTC GTG CCT GAC TTC ACC GGG CGT TACTTT GGG GAA	1081
	C T K T A D G K F V P D F T G R Y F G E	330
	GAC ATC CCC TTT GGG CTG GCC GTG ACC CGG GGC ATT GCA GAA ATA GCG GGC TGC CCC ACC	1141
	D I P F G L A V T R G I A E I A G C P T	350
	CCC AAC ATT GAC AAG ATC ATC GAA TGG GCC CAG AAG CTG ATG GGC AAG GAG TAT TTG GTT	1201
	P N I D K I I E W A Q K L M G K E Y L V	370
	GGT GGC AAG TTC ACT GGT AAA GAT ATC AGT GCA ACT AGG GCT CCA CAA CGT TAC GGG TTC	1261
	G G K F T G K D I S A T R A P Q R Y G F	390
	AAC ACC TTG GAC TCG ATT CTG TGA AAA CTT ACT TGA CGC CAC ACA ACA TCA TGC CCA TAT	1321
	N T L D S I L *	397
	TTT GTA GAG ATG GGA ACC CTT CAC CCA GTG CCA AAC ATT ATA AGC TCC AAT ACA GAA CTC	1381
	CCT GAA AAT CTG ATC GGA TAC AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA 3'	1428

図1 セグロイソメ TaDH の cDNA 配列および推定アミノ酸配列
「*」は終止コドンを示す。

5' GA GTG TGT GCG GTG GCT GTA AAC GAT CGG ACT CGC GTC TGG AAT TAC CTG GAG TAT ATT TCG	62
CAC TGT AGG TAG TGT CTA CCC ATC TGA CTT CCC AAA ATG ACG AAG AAG ATA ACC GTC CTC	122
M T K K I T V L	8
GTT TGC GGG GGA GGC AAT GGC GCC CAC GTG ACA GCT GGT CTC GCT GCA TCA CGT GAT GAC	182
V C G G G N G A H V T A G L A A S R D D	28
ATT GAA ACG AGG GTG CTC ACG ACA TTT GCT GAC GAG GCA GAA AGA TGG ACG AAC ATC ATG	242
I E T R V L T T F A D E A E R W T N I M	48
AAG GAG AAC GAT CTC AGG ATT ACC GTC GAT GAA GGT GAC ATA AAA AGC GGA GAA TCG GTA	302
K E N D L R I T V D E G D I K S G E S V	68
GAT TTT AAG GTT AAA CTC AAT TGC ATC ACC AAA GAC CCG TCC AAG GCG GTT CCG GGT GCC	362
D F K V K L N C I T K D P S K A V P G A	88
GAT GTC ATA ATT TTC ACG GTT CCA GCG TTT GCC CAC CAG AGC TAC CTC GAA GCC ATT GAG	422
D V I I F T V P A F A H Q S Y L E A I E	108
CCC TAC ATT CAA CCT AAC ACC ACC ATT GTT GGA ATG CCT GGT CAG CCT GGG TTT GAG TTC	482
P Y I Q P N T T I V G M P G Q P G F E F	128
CAG GTG TTT GAT GTG CTT AAG GAC AAG GCC AAG CAG TGT GTC ATC ATG TCG TTT GAG TCT	542
Q V F D V L K D K A K Q C V I M S F E S	148
TTG CCT TGG GCT TGT AGG ATC GCT GAA TTT GGC AAA TTT GTT CAG ATC CTG ATG GTA AAG	602
L P W A C R I A E F G K F V Q I L M V K	168
GTA AAT CTT ATG GGA TGT TTA ATT CGC GGT CAG AGC AAG CCT TCG TAT GAT CCA ATG GAA	662
V N L M G C L I R G Q S K P S Y D P M E	188
GCT GTT CAG AGA GTG ATG GGA AAA GCA CCT ATT CTT ACC CAG GCG AAT AAT TAC ATT GAA	722
A V Q R V M G K A P I L T Q A N N Y I E	208
CCA ATA CTC GCC ACT AAG TCT ATC ATC CAT CCT CCG ATA ATG TAC GGT AAA TGG AAG GAC	782
P I L A T K S I I H P P I M Y G K W K D	228
TGG GAT GGT AAA CCC ATT GAG GAG AAG CCC CTA TTC TAC CAA GGT CTT GAC GAA GAG CAA	842
W D G K P I E E K P L F Y Q G L D E E Q	248
GCT CGT TAT CTT GGC GGT ATA AGT GAC GAG TTA GTG GCG ACG GCC AAA GCT ATT GCG GCA	902
A R Y L G G I S D E L V A T A K A I A A	268
CAG AAA CCG GAA GTG GAT CTT TCC GGT GTC CTT CAC CTT TAC GAC TGG TAC CTT CGC GAT	962
Q K P E V D L S G V L H L Y D W Y L R D	288
CAC AAA CCA TAC ATC AAA GAT ACA ACC AGT CTC CTA ACT GTC TTG CAG ACA GAC ACG GCA	1022
H K P Y I K D T T S L L T V L Q T D T A	308
TAT GAC GGC CTT GTC CAT CCG ATG AAG GAA ACA GAA GAT GGC AAA TTT GTT CCA GAT TTT	1082
Y D G L V H P M K E T E D G K F V P D F	328
CGC TAC CGG TAC TTG ACA GAG GAT GTC CCG AAC GGC CTG GTG GTG ACC AAA GGG CTG GCC	1142
R Y R Y L T E D V P N' G L V V T K G L A	348
CAG ATC GCG GGC GTC CCC ACA CCC TAC CAT GAT GAG GTG ATA GCC TGG TGT CAG AAG CAG	1202
Q I A G V P T P Y H D E V I A W C Q K Q	368
CTG GGC AAG GAG ATC ATT GTT GGT GAC GAG CTG AAG GGG AAA GAT ATA GGC AGT ACA AGA	1262
L G K E I I V G D E L K G K D I G S T R	388
TGT CCC CAG CGT TAT GGC ATC AAC ACT ATG GAT GCT CTT GTT AAT ATC ATG TGA ACA ATG	1322
C P Q R Y G I N T M D A L V N I M *	405
ACG CTG TCT TTG ACG TCA GGA AAC GTA ATT GGC ATA ACA AGT AGG CCG TTC AGG GAC GGA	1382
CCA TTC ATA TTC GGG GAG GGG TGG TGG TGG GTT GTT CTG GAG TAT TAC 3'	1430

図2 エゾアワビ TaDH の cDNA 配列および推定アミノ酸配列
「*」は終止コドンを示す。

5'	GG	AGA	AAA	ACG	CTC	TAC	ACA	CTC	GGA	CAA	AGT	ATC	CCG	TGA	GAT	ATG	ACG	CTC	AAG	GTT	TGT		62
																M	T	L	K	V	C		6
	GTC	TGC	GGA	GGA	GGG	AAT	GGC	GCC	CAC	ACC	CTC	TCA	GGT	CTC	GCA	GCG	TCC	AGA	GAC	GGG		122	
	V	C	G	G	G	N	G	A	H	T	L	S	G	L	A	A	S	R	D	G		26	
	GTC	GAA	GTT	CGT	GTC	CTG	ACG	CTG	TTC	GCT	GAT	GAA	GCC	GAG	CGT	TGG	ACA	AAA	GCT	CTA		182	
	V	E	V	R	V	L	T	L	F	A	D	E	A	E	R	W	T	K	A	L		46	
	GGG	GCT	GAT	GAA	CTA	ACG	GTG	ATT	GTA	AAT	GAA	AAA	GAC	GGA	ACA	CAG	ACA	GAG	GTC	AAG		242	
	G	A	D	E	L	T	V	I	V	N	E	K	D	G	T	Q	T	E	V	K		66	
	TCA	CGC	CCA	AAG	GTC	ATT	ACC	AAG	GAT	CCT	CAA	GTT	GCC	ATC	ACT	GGG	GCG	GAT	GTT	GTG		302	
	S	R	P	K	V	I	T	K	D	P	Q	V	A	I	T	G	A	D	V	V		86	
	ATC	CTG	ACA	GTT	CCA	GCG	TTT	GCA	CAT	GAA	GGC	TAC	TTC	CAA	GCC	ATG	GCC	CCG	TAT	GTA		362	
	I	L	T	V	P	A	F	A	H	E	G	Y	F	Q	A	M	A	P	Y	V		106	
	CAG	GAC	TCA	GCT	CTT	ATC	GTA	GGC	CTT	CCA	AGC	CAG	GCG	GGT	TTT	GAA	TTC	CAA	TGT	AGG		422	
	Q	D	S	A	L	I	V	G	L	P	S	Q	A	G	F	E	F	Q	C	R		126	
	GAT	ATT	TTA	GGA	GAC	AAG	GCA	GCC	GCG	GTT	TCT	ATG	ATG	TCA	TTT	GAA	ACT	CTT	CCC	TGG		482	
	D	I	L	G	D	K	A	A	A	V	S	M	M	S	F	E	T	L	P	W		146	
	GCG	TGT	CGT	ATT	AAG	GAG	TTT	GGT	AGG	AAA	GTT	GAA	GTA	CTA	GGA	ACA	AAA	TCT	GTG	CTT		542	
	A	C	R	I	K	E	F	G	R	K	V	E	V	L	G	T	K	S	V	L		166	
	GCA	GCT	TCT	CTC	ATA	AAA	GGT	ACG	GCA	GAG	ACC	GTT	GAT	CCA	TTG	TCA	ACG	CTA	CAG	AAG		602	
	A	A	S	L	I	K	G	T	A	E	T	V	D	P	L	S	T	L	Q	K		186	
	CTC	CAC	GGT	GCC	GAA	CCA	GTC	TTC	CGC	CTT	GCC	AAA	CAC	TTT	CTA	GAG	ATG	CTG	ATC	ATG		662	
	L	H	G	A	E	P	V	F	R	L	A	K	H	F	L	E	M	L	I	M		206	
	AGC	TAC	TCG	TTT	GTC	CAT	CCT	GCC	ATT	TTG	TAT	GGC	CGA	TGG	GGT	TCA	TGG	GAC	GGT	AAC		722	
	S	Y	S	F	V	H	P	A	I	L	Y	G	R	W	G	S	W	D	G	N		226	
	CCG	GTG	TCT	GAA	GCA	CCA	CTG	TTT	TAT	CAG	GGT	ATA	GAC	CAG	GCC	ACC	GCG	GAT	ATG	TTG		782	
	P	V	S	E	A	P	L	F	Y	Q	G	I	D	Q	A	T	A	D	M	L		246	
	ACA	GCC	TGT	AGT	GAC	GAG	TGC	AAG	GCC	GTG	GGG	AAC	GCC	ATC	ATG	GCG	GCG	TGT	CCA	GGC		842	
	T	A	C	S	D	E	C	K	A	V	G	N	A	I	M	A	A	C	P	G		266	
	AAT	GAC	CTA	TCT	GAC	GTC	AAA	GAT	ATC	TAT	CAA	TGG	TAT	CTT	GAG	TAT	TAC	CAC	GAA	GAT		902	
	N	D	L	S	D	V	K	D	I	Y	Q	W	Y	L	E	Y	Y	H	E	D		286	
	ATC	CAA	GAC	GAC	CAC	GAC	CTT	TAC	CAC	GCG	ATC	ACC	ACT	AAC	AAG	TCC	TAT	AAG	GGG	CTC		962	
	I	Q	D	D	H	D	L	Y	H	A	I	T	T	N	K	S	Y	K	G	L		306	
	GTT	CAT	CCA	GTC	AAG	ACA	GTA	GAT	GGC	GGC	GTC	GCT	CCC	GAC	TTC	GGG	AAT	CGT	TAC	CTG		1022	
	V	H	P	V	K	T	V	D	G	G	V	A	P	D	F	G	N	R	Y	L		326	
	ACG	GAG	GAC	ATC	CCG	ATG	GGG	ATG	ATT	GTG	TTT	AAA	GGC	GTG	GCT	ATT	GCA	GCC	GGA	GTA		1082	
	T	E	D	I	P	M	G	M	I	V	F	K	G	V	A	I	A	A	G	V		346	
	CCC	ATC	CCT	AAC	AAC	GAC	AAG	CTG	ATC	ACG	TGG	GCT	CAG	GAG	AAG	ATC	GGA	AAG	GTG	TAT		1142	
	P	I	P	N	N	D	K	L	I	T	W	A	Q	E	K	I	G	K	V	Y		366	
	CTC	GTG	GAC	GGA	GCT	CTG	ACC	GGC	AAG	GAT	GTG	GCA	ACA	ACG	CGC	TGT	CCT	CAA	CGT	TAC		1202	
	L	V	D	G	A	L	T	G	K	D	V	A	T	T	R	C	P	Q	R	Y		386	
	GGC	TTC	AAC	ACA	CTC	AAC	GCT	ATT	CTT	ACA	GGC	AAA	AAG	GAG	TAA	CCG	GAC	AGT	GTT	GGT		1262	
	G	F	N	T	L	N	A	I	L	T	G	K	K	E	*							400	
	AGT	TAG	TGA	CCA	GTG	T	3'															1278	

図3 ホタテガイ OcDH の cDNA 配列および推定アミノ酸配列
「*」は終止コドンを示す。

5'	A CCG TCG AAG TCA ATG TGA AGG TCG TTT GAT TTC CTG GAG AAT CAC CGG CTG ACA TAC GTT	61
	AAA GTT TTG ACG GCT TTG TTA TTC TGT TAT TGA CTG ACA ATG TCA AGA AGT TTG GAA AAG	121
	M S R S L E K	7
	AGT TGT AAC ATC ACC ATA TTT GGT GGT GGT AAT GGG GCC CAT GTT TTA TCG GGT CTT TCC	181
	S C N I T I F G G G N G A H V L S G L S	27
	TCT GAC GTA GTT AAT GCC AAT GTG ACA GTT GTT GAC ACA TTC CAA GAT GAA GCT GAG AGA	241
	S D V V N A N V T V V D T F Q D E A E R	47
	TGG ACA AAA GCA ATG GCC GCC AAT GGG TTT ACA GTT AAG TAT GGG AAT GGG AAG GAT CTT	301
	W T K A M A A N G F T V K Y G N G K D L	67
	GTC CAA GCA CCT GGA AAA CCT AAG TTT ACT GTC ACT AAA GAA GTT CAG AAG AAC GTT GAG	361
	V Q A P G K P K F T V T K E V Q K N V E	87
	AAA GCA GAT GTG GTT ATT CTC TGT ATG CCA GCT TTC TTG CAC GAA ATG GTC CTT ACT TCA	421
	K A D V V I L C M P A F L H E M V L T S	107
	GTG GCA CCA TAT GTA CCA GAA ACT TGC CCC ATT GTA GGA TTA CCA GGT CAG CCG GGT TTC	481
	V A P Y V P E T C P I V G L P G Q P G F	127
	GAG TAT CAA GCA TTA TTT CAT CTT CGA CAA AAT GGC AAA AAA GGC AGC GTC ATG TCA ATT	541
	E Y Q A L F H L R Q N G K K G S V M S I	147
	GAA ACA CTT CCA TGG GCT TGC AGA ATT GCC AAG TAT GGT CAA GAA GTT GAT GTT ATT GGA	601
	E T L P W A C R I A K Y G Q E V D V I G	167
	ACA AAA GAA TGT ATA TAT TTC TCA TCA GTA GAT CAG CAG AGC AGT GGC TAT GTT GGA GCT	661
	T K E C I Y F S S V D Q Q S S G Y V G A	187
	GGA TTG GTT CAA CTT ATT CAG ACC CTT CTT GGT GCA AAG CCA GTG CTC AAA CGG GAA GAA	721
	G L V Q L I Q T L L G A K P V L K R E E	207
	AAT ATC ATC AAG TAC ACA TTC TTG TAC CGT CCA ACT GTT CAT CCT CCA CTC ATG TAT GCC	781
	N I I K Y T F L Y R P T V H P P L M Y A	227
	AAA TGG AAA AAC TGG GAT GGT AAA CCA TTA GAT GCA GCT CCT CTC TTC TAC CAA GGT GCT	841
	K W K N W D G K P L D A A P L F Y Q G A	247
	GAT GAA GAA GCT GTG AAG TAT CTT GAT GGT GCC ACA AAT GAA ATG ATT AAG ATC GCT GAT	901
	D E E A V K Y L D G A T N E M I K I A D	267
	TTC CTT CAA ACA AAA TAT CCT GAC ATG GAT TTT TCG GGC ATT TCA TCT ATG CAG GAC TGT	961
	F L Q T K Y P D M D F S G I S S M Q D C	287
	TTT ATA GGT GAA TAT CCA GAA CAG ATC AAA GAT AAG AGT ACC CTC CTC TCA TGT TTG AAG	1021
	F I G E Y P E Q I K D K S T L L S C L K	307
	ACA AAC CAA GCT TAT GAT GGA TTG GTT CAT CCC ATG AAG AAG ACG GAT GAT GGT AAG TTT	1081
	T N Q A Y D G L V H P M K K T D D G K F	327
	GTA CCA GAT TTC AAG TAC AGA TAT TTG ATG GAA GAT GTT CCT TAT GGT TTG TTG ATT ATC	1141
	V P D F K Y R Y L M E D V P Y G L L I I	347
	AAG CAG ATA GCT GAG ATG GCT GGT GTG GCT ACA CCT ATA ATT GAT GAA ATA ATC CTT TGG	1201
	K Q I A E M A G V A T P I I D E I I L W	367
	GCT CAG ACG AAA CTG GAC GCT GAA TAT CTG AAA GAT GGA AAA TTA TGC TTT GTG GAC AGA	1261
	A Q T K L D A E Y L K D G K L C F V D R	387
	AAA CAT GGC AGA ATA CCT ATG GCA TTT GGA ATA AAG ACC CTG GAG GAG TTT GTT AAC TAC	1321
	K H G R I P M A F G I K T L E E F V N Y	407
	TGC AAG TAA ACA TTT GTA ACA TTT ACC CTA GAA GTA AAA GGA ATG ACA TCA TAC AG 3'	1377
	C K *	409

図4 ウバガイ OcDH の cDNA 配列および推定アミノ酸配列
「*」は終止コドンを示す。

5'	GAC TGT CTT ACT AGT GCA TCT ACG TAT CAT CTT GTA CAA AAA TCA GAT TGT GAG GAA TGC	60
	CAT AGA CGT AAC AAA ACA GTT TTG AAT TTG GTT TGA CAA AGG CAA GCT CTG TGC ACA TCA	120
	AAT ATG GCG GGA TTC CAA GAC AAA ATC CAC GTC ACG ATC TGC GGT GGA GGG AAC GGC GCC	180
	M A G F Q D K I H V T I C G G G N G A	19
	CAT ACT TTC GCC GGA ATT TCT TCT TTG GTT CCA AAT GCA AAT GTT ATT GTT CTT GAT ATA	240
	H T F A G I S S L V P N A N V I V L D I	39
	TAT GAA GAC GAA GCG GAA AGA TGG ACT GAG AGT ATG AAA ACT CAT GGT TTC GCA GTT AAA	300
	Y E D E A E R W T E S M K T H G F A V K	59
	CGT AGT GAT GGT AAA ATA TTG CAC CAG AAG CCG GGC AGC GTA AAT TTC AGT GTA ACA AAA	360
	R S D G K I L H Q K P G S V N F S V T K	79
	GAT GTG AAA TCT GTT GTT CCG AAA TCA GAC ATT GTG ATC ATA ACG GTT CCA GCA TAC ACG	420
	D V K S V V P K S D I V I I T V P A Y T	99
	CAC GAA ACA TAT CTG AAT ATC ATT GCA CCT TAT TTG CCG GAG TCG TGT CCT GTT GTT GGA	480
	H E T Y L N I I A P Y L P E S C P V V G	119
	ATG CCT GGC CAG CCG GGA TTT GAA TAT CAA GCG CTA ACC ATT CTT AAA GAA AAC AAC AAA	540
	M P G Q P G F E Y Q A L T I L K E N N K	139
	AAA TGT CCC GTT ATG TCC ATT GAA ACA CTG CCA TGG GCT TGC AGG ATT TCG AAA TAC GGA	600
	K C P V M S I E T L P W A C R I S K Y G	159
	CAG GAG GTG GTA ATG GTC GGC ATA AAA GAA GAA GTG TGC TAC ACA TTT ATA GAG CAA AAT	660
	Q E V V M V G I K E E V C Y T F I E Q N	179
	AAA ATT AGT ATG GAA GCG TTG AAA ATG AGT CCA GTG AGT CTT TTA CAA ACA CTT CTA GGT	720
	K I S M E A L K M S P V S L L Q T L L G	199
	CAA AAA CCA ATA CTT CAG CGA GAA GAT AAT ATT TTA AAG TAC ACA TTT CTG TGT AGA CCT	780
	Q K P I L Q R E D N I L K Y T F L C R P	219
	ACA ATA CAT CCA CCT ATT ATG TAT GCG AGA TGG AAA GAC TGG AAT GGC GAA CCA CTG GAG	840
	T I H P P I M Y A R W K D W N G E P E E	239
	ACA CCG CCG CTG TTT TAC CAG GGT GTC GAT GAA AGC TCG GTG AAA TAC CTT GAC GGT CTA	900
	T P P L F Y Q G V D E S S V K Y L D G L	259
	ACA AAT GAG GTA CTT GAA ACG GCA GAA GCG CTG AAA GAA TAT CTG CCC GGG CTG GAT TTC	960
	T N E V L E T A E A L K E Y L P G L D F	279
	ACT GGC GTT TCA ACG ATG CAA CAA TGG CTG TTA GAC CAT TAC ACC GAT CAA ATT GAG GAC	1020
	T G V S T M Q Q W L L D H Y T D Q I E D	299
	AAG AGT TCA CTA CTC ACG TGT TTA AAA ACC AAC AAA GCA TAT GAT GGT CTA CTT CAT CCT	1080
	K S S L L T C L K T N K A Y D G L L H P	319
	ACC ACA CGA ACA GCC GAG GGA AAA TAC GTT CCA GAT TTT ACC TAT CGC TAT GTC AGG GAA	1140
	T T R T A E G K Y V P D F T Y R Y V R E	339
	GAC GTT CCT TAT GGT TTG ATA GTG CTT CGT CAA ATA GCC GAC ATG GTC GAA GTT AGG ACG	1200
	D V P Y G L I V L R Q I A D M V E V R T	359
	CCC ATT ATT GAT GAG ATT ATT GAG TGG GCC CAA ACA AAG ATA GGT GTA CAG TTT TTA CAG	1260
	P I I D E I I E W A Q T K I G V Q F L Q	379
	GAT GGA AAG CTA TGC GAC CTT GAC AGG GCT AAA GGC AGG CTT CCG AAG ACC TAC GGC ATC	1320
	D G K L C D L D R A K G R L P K T Y G I	399
	AAT TCC ATT GAA GAA TTT GTT AAT TTT TTT GCC TAA TAC AAT CTG CAG GCT TTA ATG GTT	1380
	N S I E E F V N F F A *	410
	TAA CGC ATT GCG TTA ATT TGC TTT CTT TGG GGC GAC TTA AGG TTT CAA CTT CTG TAG AAA	1440
	AAA ATA TTG TCC GCG TAA TTT AAT CAA GTG T 3'	1471

図5 ハマグリ OpDH の cDNA 配列および推定アミノ酸配列

「*」は終止コドンを示す。異なる塩基も解析された部分、およびそれによってアミノ酸配列が変化する部分は網掛けをしてある。

表1 汎用プライマーの配列

プライマー	配列 *
ODH-9F	5' -GCTGACGARGCMGAGMGVTGG-3'
ODH-11R	5' -CGRCAVGCCCARGGRAGRGWYWCRAA-3'

* YはTおよびCを含む
RはAおよびGを含む
MはAおよびCを含む
VはA、GおよびCを含む
WはAおよびTを含む

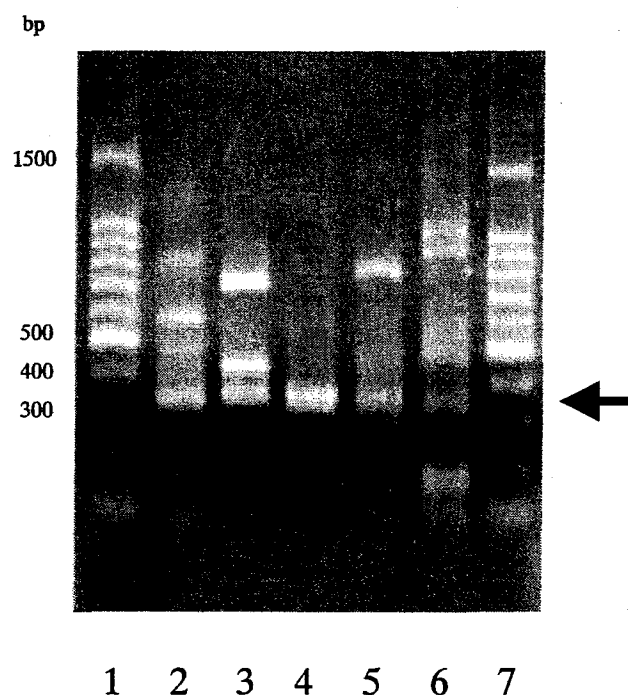


図6 各種海産無脊椎動物におけるODH-9FおよびODH-11RでのPCRによる増幅
矢印は目的の断片を示している。

レーン1および7 100bp DNA Ladder、レーン2 *Arabella iricolor*、
レーン3 *Haliotis discus hannai*、レーン4 *Patinopecten yessoensis*、
レーン5 *Spisula sachalinensis*、レーン6 *Meretrix lusoria*

表2 粗抽出物における活性

由来	大腸菌	基質	見かけの活性(U/tube)*				平均	偏差	AA(-)	Pyr(-)
セグロイソメ Wild type	JM109	Taurine	173	193	188	168	180.5	11.9	1.21	0.37
セグロイソメ Wild type	FMJ39**	Taurine	227	319	329	227	275.5	56.2	-	-
エゾアワビ Wild type	JM109	Taurine	82	76	82	86	81.5	4.1	1.17	0.45
エゾアワビ T2A mutant	JM109	Taurine	42	46	48	47	45.8	2.6	1.21	0.56
ウバガイ Wild type	JM109	Arginine	16	15	15	16	15.5	0.6	0.73	0.23
ウバガイ Wild type	FMJ39	Arginine	40	45	47	48	45.0	3.6	0.65	0.54
ホタテガイ T2A mutant	FMJ39	Arginine	1.20	1.21	1.22	1.24	1.218	0.017	0.50	0.47

AA(-) アミノ酸基質なし

Pyr(-) ビルビン酸およびアミノ酸基質なし

- 未測定

* 酵素のユニット数は、5ml の培地の入った試験管 1 本当たりの量である

** この株は南イリノイ大学の David P. Clark 博士より分与された

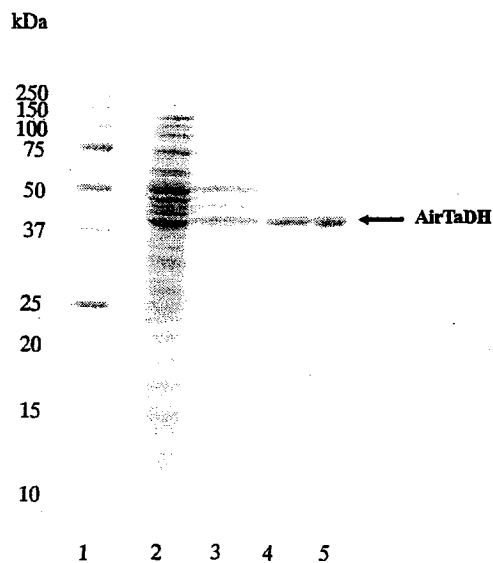


図 7 各精製段階における組換えセグロイソメ TaDH の SDS-PAGE

レーン 1 分子量マーカー、

レーン 2 粗酵素液、

レーン 3 ゲル濾過クロマトグラフィー活性画分、

レーン 4 アフィニティークロマトグラフィー活性画分、

レーン 5 イオン交換クロマトグラフィー活性画分

表3 セグロイソメ組換え TaDH 完全精製物における相対活性

基質	
100 mM Taurine	100.0
100 mM L-Alanine	<0.1
100 mM β -Alanine	0.2
100 mM Glycine	0.1
10 mM L-Arginine	-
100 mM L-Lysine	-

- 活性は認められなかった

表4 エゾアワビ組換え TaDH 部分精製物における相対活性

基質	Wild type	T2A mutant
100 mM Taurine	100.0	100.0
100 mM L-Alanine	5.3 *	4.8 *
100 mM β -Alanine	0.5	0.4
100 mM Glycine	0.4	0.4
10 mM L-Arginine	-	-
100 mM L-Lysine	-	-

* 1%有意差あり

- 活性は認められなかった

表5 ウバガイ組換え OcDH 部分精製物における相対活性

基質	JM109	FMJ39
10 mM L-Arginine	100.0	100.0
100 mM L-Lysine	3.8	3.7
100 mM L-Alanine	-	-
100 mM β -Alanine	-	-
100 mM Glycine	-	-
100 mM Taurine	-	-

- 活性は認められなかった

<i>A. iricolor</i>	M-----VVLTIQCGNAHTLAGIASNQPNMEVRVLTLYADEAERWIKSMETNDFTTIKYATGK-
<i>H. discus hannai</i>	M-----TKKITVLCVCGNGHVTAGLAASRDDIETRVLTTFADAERWTNIMKENDLRTIVDEGDIK
<i>F. oregonensis</i>	M-----ADKLTVCVCGNGHVTAGLAASRDGTEARVLTTFQDEAPRWANIMKEENFTIQQNKPKD-
<i>P. yessoensis</i>	M-----TLKVCVCGNGHVTLAGLAASRDGVEVRVLTTFADAERWTNIMKENDLRTIVDEGDIK
<i>P. maximus</i>	M-----TVKVCVCGNGHVTLAGLAASRDGVEVRVLTTFADAERWTNIMKENDLRTIVDEGDIK
<i>S. sachalinensis</i>	M-----SRSLEKSCNITIFCGNGHVTLAGLAASRDGVEVRVLTTFQDEAPRWANIMKEENFTIQQNKPKD-
<i>M. lusoria-1</i>	M-----AGFQDKIHVTICGNGHVTAGISSLPVNAVTVLDIYEDAEERTESMKTHGFAVKRSDGKI-
<i>M. lusoria-2</i>	M-----AGFQDKIHVTICGNGHVTAGISSLPVNAVTVLDIYEDAEERTESMKTHGFAVKRSDGKI-
<i>S. officinalis</i>	M-----MAHHQEKPPVILNLLVCGNGHVTLAGLAASRDGVEVRVLTTFADAERWTNIMKENDLRTIVDEGDIK
<i>L. vulgaris</i>	M-----MAHHQEKPPVILNLLVCGNGHVTLAGLAASRDGVEVRVLTTFADAERWTNIMKENDLRTIVDEGDIK
<i>L. opalescens</i>	M-----THQEKPPVILNLLVCGNGHVTLAGLAASRDGVEVRVLTTFADAERWTNIMKENDLRTIVDEGDIK
	* **** * * * * *
<i>A. iricolor</i>	--DPVHLKTKPKLVTKNPEQGATGADIIVITVPFAFAHAQYLTALKPHVKPGTVVVGFGPGQGFDFEIMKI
<i>H. discus hannai</i>	SGESYDFKVKLNCITKDPKAVPGADVIFTVPFAFAHQSYLEAIEPYIQPNTIIVGMPGQGFDFEIMKI
<i>F. oregonensis</i>	--SVVHIKAKPALVTKDASQAVPGANIIFCVPFAFAHAQYFKAIEPYVYPNTAIIIGLPGQGFDFEIMKI
<i>P. yessoensis</i>	--TQTEVKSRLPKVITKDPQVITGADVILTVPAFAHEGYFQAMAPYVQDSALIVGLPSQAGFEQCRDI
<i>P. maximus</i>	--TQTEVKSRLPKVITKDPQVITGADVILTVPAFAHEGYFQAMAPYVQDSALIVGLPSQAGFEQCRDI
<i>S. sachalinensis</i>	--LVQAPGKPKFTVTKVEQKVEKADVILCMAFLHEMVLTSVAPYVPETCPVIGLPGQGFDFEIMKI
<i>M. lusoria-1</i>	--LHQKPGSVNFVTKDVKSVVPKSDIIVITVPAYTHETYLNIAPYLPESCVPVGMPPGQGFDFEIMKI
<i>M. lusoria-2</i>	--LHQKPGSVNFVTKDVKSVVPKSDIIVITVPAYTHETYLNIAPYLPESCVPVGMPPGQGFDFEIMKI
<i>S. officinalis</i>	--TNKIITSRPNMINTDPSRAVPGCNLVIITVPFAFAHEGYFRAIAPYLEPNTVIVGLPSQGFQFQCCDL
<i>L. vulgaris</i>	--SSQIITSRPNMINTDPSRAVPGCNLVIITVPFAFAHEGYFRAIAPYLEPNTVIVGLPSQGFQFQCCDL
<i>L. opalescens</i>	--SNKIITSRPNMINTDASKAVPGCNLVIITVPFAFAHEGYFRAIAPYLEPNTVIVGLPSQGFQFQCCDL
	* ** * * * *
<i>A. iricolor</i>	WGDLAKQCTVMNFVSLWACRIKEFGKSVLEVLTAKDMFGSVRNGT----VAPKMDPTAMIQCGCLGPLR
<i>H. discus hannai</i>	LKDKAKQCVIMSPFESLWACRIKEFGKSVLEVLTAKDMFGSVRNGT----SKPSYDMEAVQVRMKGAPI
<i>F. oregonensis</i>	LKDKARQCAITLSESEFWACRIKEFGKSVLEVLTAKDMFGSVRNGT----SQLKPDPAKTLQAMLGEHPV
<i>P. yessoensis</i>	LGDKAAAVSMMSFETELWACRIKEFGKSVLEVLTAKDMFGSVRNGT----TAKTVDPSTLQMLHGAEPV
<i>P. maximus</i>	LGDKAAAVSMMSFETELWACRIKEFGKSVLEVLTAKDMFGSVRNGT----TAKTVDPSTLQMLHGAEPV
<i>S. sachalinensis</i>	LQNGKKGKSVMSIETELWACRIKEFGKSVLEVLTAKDMFGSVRNGT----SSGYVAGLVQLITLLGAKPV
<i>M. lusoria-1</i>	LKENNKCPVMSIETELWACRIKEFGKSVLEVLTAKDMFGSVRNGT----SMEALKMSVSLQLITLLGAKPV
<i>M. lusoria-2</i>	LKENNKCPVMSIETELWACRIKEFGKSVLEVLTAKDMFGSVRNGT----SMEALKMSVSLQLITLLGAKPV
<i>S. officinalis</i>	LGLGGRTSAIVSFESLWACRIKEFGKSVLEVLTAKDMFGSVRNGT----CKTLFPILPTIQYVIGKEPK
<i>L. vulgaris</i>	LGLGGRTSAIVSFESLWACRIKEFGKSVLEVLTAKDMFGSVRNGT----CKTLFPILPTIQYVIGKEPK
<i>L. opalescens</i>	LGMGGRTSAIVSFESLWACRIKEFGKSVLEVLTAKDMFGSVRNGT----CKPLFPVLTIQYVIGKEPK
	***** * * * *
<i>A. iricolor</i>	LECSGHLGMSIMAVNGMLHPSIMYNRWHDWDGKVPDAPPLETGLSQAQADLLSDVSNETIAIAKKVME
<i>H. discus hannai</i>	LTQANNIEPILATKS-I IHPPIMYGKWKDWDGKPIEEKPLETOGLDEEQARYLGGISDELVATAKATAA
<i>F. oregonensis</i>	LKMAHNYLEPYLMTKS-IVHPPIMYGRWKDWDGQPMAEKPLETOGLDEFGAGSLSTVSDEVLDTARAITK
<i>P. yessoensis</i>	FRLAKHFLEMLMSYS-FVHPAILYGRWGSWDGNPVEAPLETOGLDQATADMLTACSDCKAVGNAIMA
<i>P. maximus</i>	FRLAKHFLEMLMSYS-FVHPAILYGRWGSWDGNPVEAPLETOGLDQATADMLTACSDCKAVGNAIMA
<i>S. sachalinensis</i>	LKREENIIKYTFLYRP-TVHPPIMYAKWKNWDGKPLDAAPLETOGLDEEAVKYLDGATNEMIKIADFLQT
<i>M. lusoria-1</i>	LQREDNIIKYTFLCRP-TIHPPIMYARWKDWNGEPLTTPLETOGLDESSVKYLDGLTNEVLETAALKE
<i>M. lusoria-2</i>	LQREDNIIKYTFLCRP-TIHPPIMYARWKDWNGEPLTTPLETOGLDESSVKYLDGLTNEVLETAALKE
<i>S. officinalis</i>	LTLAANYLSINLLADS-VVHPPIMYGTWKDWDGQVPAEKPLETOGLNEFSADLLDKVSTELVHTAQAIQQ
<i>L. vulgaris</i>	LTLAANYLSINLLADS-VVHPPIMYGTWKDWDGQVPAEKPLETOGLNEFSADLLDKVSTELVHTAQAIQQ
<i>L. opalescens</i>	LTLAANYLSINLLADS-VVHPPIMYGTWKDWDGQVPAEKPLETOGLNEFSADLLDKVSTELVHTAQAIQQ
	** * * * * *
<i>A. iricolor</i>	QRQGVDLNVIMHPYIIGAYPDDISDKSSLYTCINTNAGFKGLTHPCTKTADGKFVDPFICRYTGEDIP
<i>H. discus hannai</i>	QKPEVDLSGVHLHYDYLWYRDKPYIKDTSLLTVLQDTAYDGLVHPMKETEDGKFVDPFICRYTGEDIP
<i>F. oregonensis</i>	QKPELDLPHVEHLLWYRQDYRETVKDPSTLLTAMRTNTAYNGLVHPMKDAGNKVVPDFICRYTGEDIP
<i>P. yessoensis</i>	ACPGNDLSDVKDIYQWYLEYHEDIQDDHDLYHAITTNKSYKGLVHPVKTVDGG-VAPDFGNRYLTEDIP
<i>P. maximus</i>	ACPGNDLSDVKDIYQWYLEYHEDIQDDHDLYHAITTNKSYKGLVHPVKTVDGG-VAPDFGNRYLTEDIP
<i>S. sachalinensis</i>	KYPDMDFSGISSMQDCFIGEYPEQIKDKSTLLSCLKTQAYDGLVHPMKKTDGKFVDPFICRYTGEDIP
<i>M. lusoria-1</i>	YLPGLDFTGVSTMQWLLDHYTDQIEDKSSLLTCLKTQAYDGLLHPITRTAEGKYVDPFICRYTGEDIP
<i>M. lusoria-2</i>	YLPGLDFTGVSTMQWLLDHYTDQIEDKSSLLTCLKTQAYDGLLHPITRTAEGKYVDPFICRYTGEDIP
<i>S. officinalis</i>	KYPDMMDKDVILHFDWYKLYKESIQDMSNLQAMKTCAYDGLVHPMKETPDGKFVDPFICRYTGEDIP
<i>L. vulgaris</i>	KYPDMMDKDVILHFDWYKLYKESIQDMSNLQAMKTCAYDGLVHPMKETPDGKFVDPFICRYTGEDIP
<i>L. opalescens</i>	KYPDMMDKDVILHFDWYKLYKESIQDMSNLQAMKTCAYDGLVHPMKETPDGKFVDPFICRYTGEDIP
	* * * * * *
<i>A. iricolor</i>	EGLAVTRGIAEAGCPTPNIDKIEWAQKLMGKEYLVGGKFTGKDISATRAPQRYGFNTLDSIL----
<i>H. discus hannai</i>	NGLVVTGKLAQIAGVPTPYHDEVIWACQKQLGKEIIVGDELKGDIGSTRCPQRYGINTMDALVNM--
<i>F. oregonensis</i>	EGLVVTGKLAQIAGVPTPETDRVLAWCQDKLGKEFIVGSELKGDMTSSRAPQAYGFKSLDDLALM--
<i>P. yessoensis</i>	MGMIVFKGVAIAAGVPIPNNDKLIWAQEKIGKVYLVGALTGKDVATTTRCPQRYGFNTLNAILTCKKE
<i>P. maximus</i>	MGMIVFKGVAIAAGVPIPNNDKLIWAQEKIGKVYLVGALTGKDVATTTRCPQRYGFNTLNAILTCKKE
<i>S. sachalinensis</i>	YGLLIQKQIAEMAGVATPIIDEIILWAQTKLDAEYLDGKLCFVDRKHGRIPMAFGIKTLEEFVNYCK-
<i>M. lusoria-1</i>	YGLIIVLRQIADMVEVRTPIIDEIIEWAQTKIGVQFLQDGKLCDLDRAGRLPKTYGINSIEEFVNFFA-
<i>M. lusoria-2</i>	YGLIIVLRQIADMVEVRTPIIDEIIEWAQTKIGVQFLQDGKLCDLDRAGRLPKTYGINSIEEFVNFFA-
<i>S. officinalis</i>	FGMVVFRGIAELAGVPTPAMDETITWGQKILGKEFLVNGKLQKDMNLTAPQRHFNSFLDLVNLR--
<i>L. vulgaris</i>	FGMVVFRGIAELAGVPTPAMDETITWGQKILGKEFLVNGKLQKDMNLTAPQRHFNSFLDLVNLR--
<i>L. opalescens</i>	FGMVVFRGISELAGVPTPAMDETITWGQKILGKEFLVNGKLQKDMNLTAPQRHFNSFLDLVNLR--
	* * * * * *

図8 推定アミノ酸配列の多重アライメント

「*」は全種で一致する残基を示す。保存性の高い部分は網掛けで示してある。
NADH 結合に関与していると考えられる残基は黒地に白文字で示してある。

表 6 核酸（対角線上側）およびアミノ酸（対角線下側）配列相同性

Taxon	Air	Hdi	For	Pye	Pma	Ssa	Mlu-1	Mlu-2	Sof	Lvu
<i>Arabella iricolor</i> (Air)		55	55	56	56	54	23	23	54	56
<i>Haliotis discus hannai</i> (Hdi)	46		61	56	57	51	55	47	58	55
<i>Fusitriton oregonensis</i> (For)	45	61		55	54	37	29	29	56	55
<i>Patinopecten yessoensis</i> (Pye)	47	49	47		84	49	45	45	55	56
<i>Pecten maximus</i> (Pma)	47	49	47	95		49	22	21	54	55
<i>Spisula sachalinensis</i> (Ssa)	40	40	37	38	38		61	61	51	51
<i>Meretrix lusoria</i> -1 (Mlu-1)	40	40	38	37	37	57		98	21	22
<i>Meretrix lusoria</i> -2 (Mlu-2)	40	40	38	36	36	57	98		22	22
<i>Sepia officinalis</i> (Sof)	40	51	51	49	49	38	37	36		84
<i>Loligo vulgaris</i> (Lvu)	42	52	50	48	48	40	37	36	89	
<i>Loligo opalescens</i> (Lop)	42	52	51	48	48	39	37	37	90	93

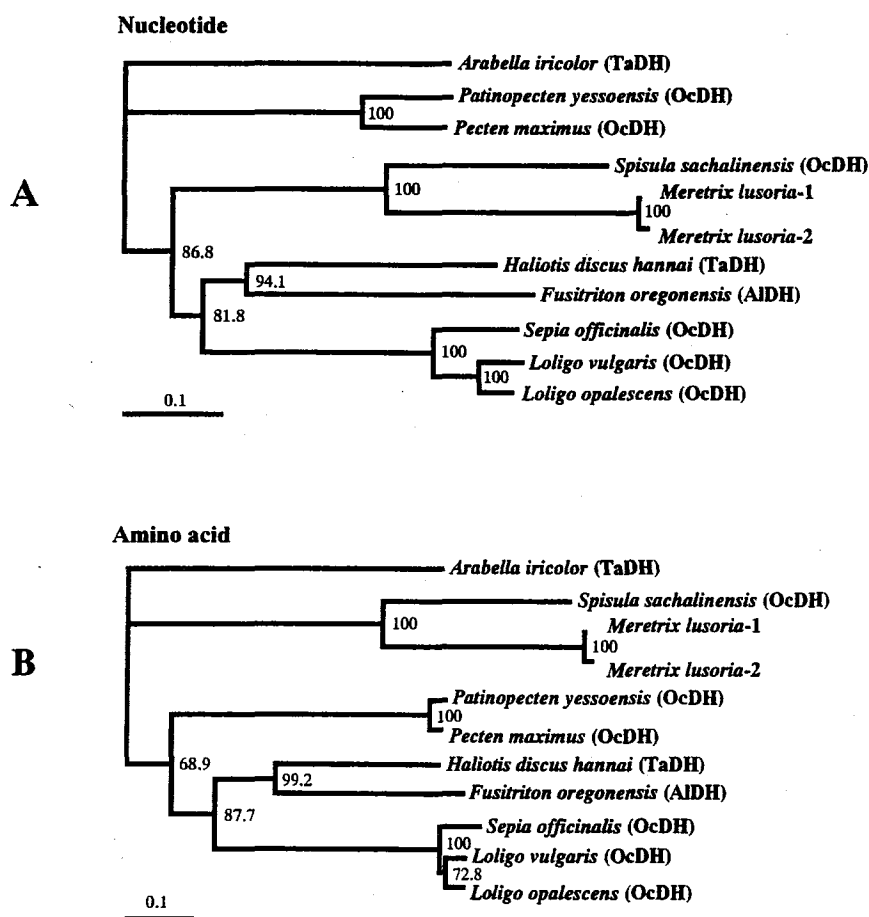


図 9 核酸 (A) およびアミノ酸 (B) 配列相同性から作成した系統樹

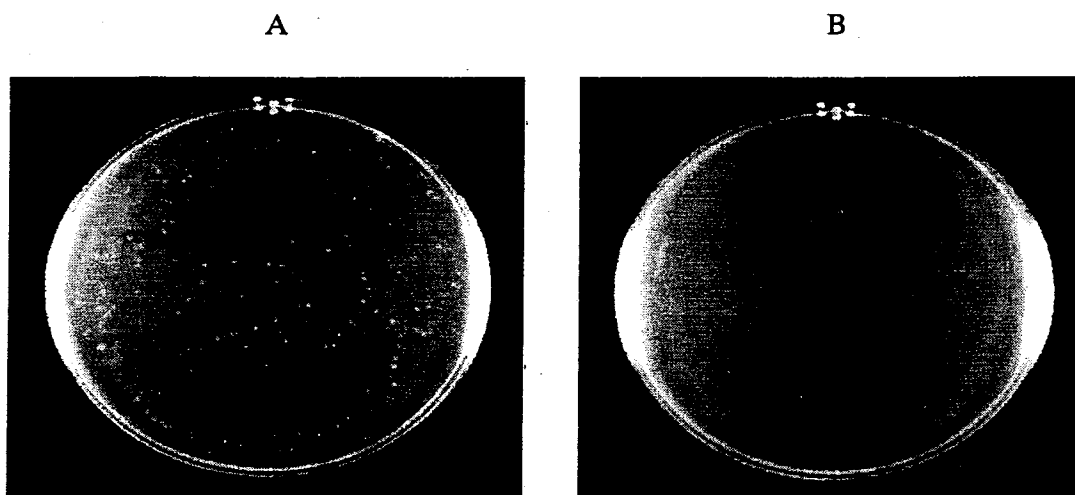


図 10 37℃で一週間嫌気培養を行ったシャーレの写真

(A) pTVSsaFMJ39、(B) FMJ39

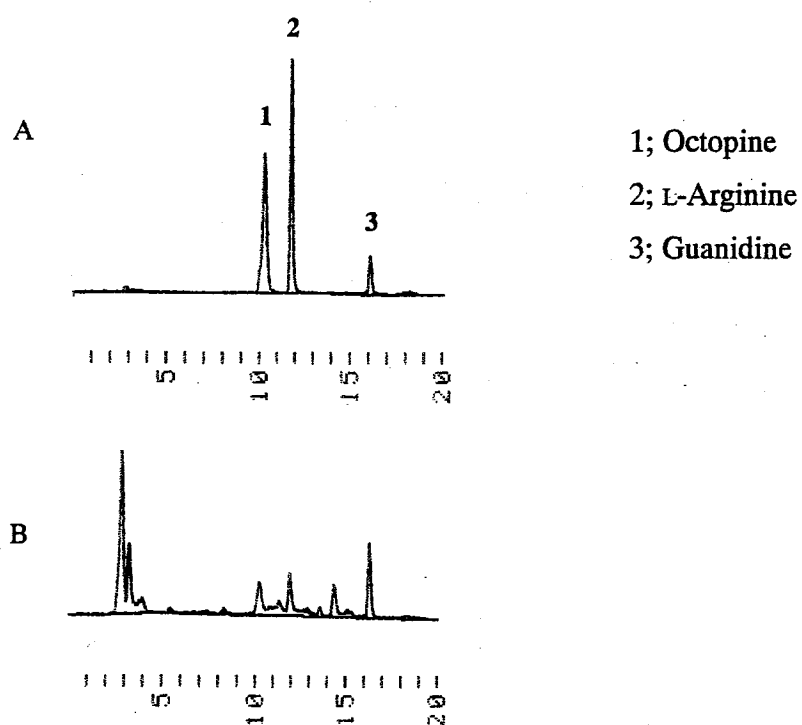


図 11 pTVSsaFMJ39 のエキス成分の HPLC クロマトグラム

(A) 標準サンプル、(B) pTVSsaFMJ39 のエキス成分

論文審査結果要旨

オピンデヒドロゲナーゼ (OpDHs) は、アミノ酸とピルビン酸を基質とし、NADH を補酵素としてオピン類を生合成する酸化還元酵素である。アミノ酸特異性からオクトピンデヒドロゲナーゼ (OcDH), アラノピンデヒドロゲナーゼ (AIDH), ストロピンデヒドロゲナーゼ (StDH), タロピンデヒドロゲナーゼ (TaDH) および β -アラノピンデヒドロゲナーゼ (β -AIDH) に分類されている。OpDHs はこれまでの研究により脊椎動物の乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) と同義的役割, すなわち嫌気的環境下でのエネルギー産生に重要な役割を持っているとされており, 嫌気環境に曝した後や激しい運動をさせた後にオピン量が増加するといった間接的証明はされているが, 遺伝子操作による直接的な証拠は得られていない。また, オピンデヒドロゲナーゼは各種無脊椎動物に広く分布し, 一部については酵素化学的性質も明らかにされているが, アミノ酸配列などの分子構造についてはほとんど知られていない。

本研究で, セグロイソメ, エゾアワビ, ホタテガイ, ウバガイおよびハマグリのおピンデヒドロゲナーゼの完全 cDNA 配列解析により一次構造であるアミノ酸配列情報を明らかにした。この際設計したプライマーのうち, ODH-9F および ODH-11R は各種無脊椎動物 OpDHs の cDNA 増幅が可能で, それで得られる内部配列の解析を足がかりとする方法は, 多くの種で OpDHs の cDNA 解析を可能にした。すなわち ODH-9F および ODH-11R は無脊椎動物 OpDHs の cDNA 解析研究で汎用プライマーとして利用できると言える。

OpDHs はそれぞれ利用するアミノ酸が異なる (生成するオピンの種類も異なる) ことより, cDNA 解析だけではアミノ酸基質特異性 (OpDHs の種類) を特定することはできない。そのため, 解析した配列を基に大腸菌で発現させ, 実際に酵素活性を測定し OpDHs の種類を特定する必要がある。本研究ではいずれの OpDHs 遺伝子の発現も成功し, セグロイソメおよびエゾアワビのは TaDH, ホタテガイおよびウバガイのは OcDH などと OpDHs の種類を明らかにした。

推定アミノ酸配列を多重アライメントに供した結果, 全体的に変異が多いものの, 非常に保存性の高い部分も散在し, その内の一つは補酵素 NADH の結合に関与している共通配列であることが示唆された。また, OpDHs 遺伝情報から作成した系統樹は, これまでの形態学および解剖学的解析に基づく系統分類と一致していた。OpDHs は近縁関係に応じて変異の程度が大きく変化しており, OpDHs ファミリーの cDNA 解析は, 未だ不明な点が多い系統進化, とりわけ海産軟体動物間の科および属レベルでの類縁関係を明らかにするために役立つと考えられた。

ウバガイ OpDH 遺伝子を嫌気環境・最少培地で増殖できない大腸菌 FMJ39 株に導入した結果, FMJ39 株が嫌気環境・最少培地でも増殖することが確認された。このことは, OpDHs が LDH と同様に嫌気環境における NAD^+ の供給者として機能し, 機能的に LDH と置き換え可能であることがはじめて示された。本研究により, OpDHs の主な生理機能は, 嫌気環境下における解糖を維持するための NAD^+ 供給であり, 嫌気環境下でのエネルギー産生に重要な役割を持っていることが直接的に証明された。

以上のように, 本研究は 5 種の海産無脊椎動物においてオピンデヒドロゲナーゼの cDNA 配列を明らかにし, それらの大腸菌での発現に成功し, それらの相同性や分子進化について解析し, 組換え大腸菌を用いてその主たる生理機能を明らかにしたもので, 審査員一同は博士 (農学) の学位を授与するに値すると判定した。